

# METODOLOGIAS RÁPIDAS E DE BAIXO CUSTO PARA TRATAMENTO E RECUPERAÇÃO DE ALGUNS SOLVENTES ORGÂNICOS UTILIZADOS EM SEPARAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

João Oiano-Neto<sup>1\*</sup>; Andressa Moreira de Souza<sup>1</sup>; Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago<sup>1</sup>; Marcelly Cristina da Silva Santos<sup>1</sup>; Sidney Pacheco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Agroindústria de Alimentos. Avenida das Américas 29.501, Guaratiba, CEP: 23.020-470, Rio de Janeiro - RJ. \*E-mail: oiano@ctaa.embrapa.br

## ABSTRACT

Many laboratories of chromatographic analysis use different solvents as acetonitrile, hexane, chloroform, etc. which generate high quantities of residues during the analyses or by storing solvents out of validity. In both cases, such waste must be disposed safely to avoid environmental contamination. In this study some methodologies were developed for treatment and recovery of acetonitrile, hexane and chloroform in few steps and with low consumption of reagents. All solvents were obtained in high yields and with adequate purity for application in separations by column chromatography and HPLC.

**Palavras-chave:** acetonitrila, cromatografia, clorofórmio, hexano, solventes orgânicos.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CLOROFÓRMIO

O clorofórmio é um solvente não inflamável, altamente volátil e amplamente utilizado em várias áreas de pesquisa como fitoquímica, bioquímica, biologia molecular, etc. (WINDHOLZ et al., 1983). Decompõe-se na presença de luz, agentes oxidantes, ácidos e bases fortes, magnésio e sódio metálicos produzindo gás cloro, fosgênio ( $\text{COCl}_2$ ) e ácido clorídrico (HCl). É comercializado em frasco âmbar e estabilizado com 0,5-1% de etanol ou 100-300ppm de amileno (WINDHOLZ et al., 1983). O fosgênio presente no clorofórmio é eliminado pela agitação com solução alcalina. No entanto, devido à alta reatividade do clorofórmio à luz e ao oxigênio, a eliminação completa do fosgênio não é obtida (MORITA & ASSUMPÇÃO, 2001). Um processo simples de purificação do clorofórmio comercial envolve as etapas de lavagem com água, secagem com  $\text{CaCl}_2$ , refluxo sob  $\text{P}_2\text{O}_5$ , agitação com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , lavagem com água, secagem com  $\text{CaCl}_2$ , filtração e destilação (PERRIN & ARMAREGO, 1988).

### 1.2. ACETONITRILA

A acetonitrila é um subproduto da produção da acrilonitrila aplicada na fabricação de fibras têxteis. É utilizada quando se necessita de um solvente orgânico com grande constante dielétrica, em reações que requerem ionização ou como solvente em titulações não aquosas (WINDHOLZ et al., 1983). É um solvente com ampla aplicação em laboratórios que utilizam a CLAE com colunas de fase reversa ( $\text{NH}_2$ ,  $\text{C}_8$  e  $\text{C}_{18}$ ). Na análise de açúcares com colunas amino e detector de índice de refração é o solvente de escolha e "transparente" na detecção por UV-vis. (SNYDER et al., 1997). No auge da crise econômica, o valor da acetonitrila grau HPLC apresentou uma alta de 960% e sendo comercializada a R\$ 2.650,00/4L. Os processos de purificação da acetonitrila comercial podem envolver várias destilações sob  $\text{P}_2\text{O}_5$  ou agitação com NaOH aquoso, sucessivas lavagens com água, adição de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e destilação sob  $\text{P}_2\text{O}_5$  (PERRIN & ARMAREGO, 1988).

### 1.3. n-HEXANO

O n-hexano é um hidrocarboneto inflamável e incompatível com oxidantes fortes (WINDHOLZ et al., 1983). É o principal componente do éter de petróleo e um solvente muito

utilizado em separações cromatográficas em fase normal e na purificação de extratos vegetais para eliminação de lipídios. Os métodos de purificação de hexano envolvem a destilação azeotrópica, adsorção em sílica gel, adsorção em alumina básica, purificação com ácido clorosulfônico (MORITA & ASSUMPÇÃO, 2001). A agitação com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  é realizada até o ácido permanecer incolor, seguido de neutralização com NaOH, lavagem com água, secagem com  $\text{CaCl}_2$  e destilação. O solvente destilado é então seco com sódio metálico,  $\text{P}_2\text{O}_5$ , passado através de coluna de sílica ou peneira molecular e submetido à destilação fracionada. A agitação com ácido permite a eliminação de impurezas aromáticas, graxas e ftalatos (MORITA & ASSUMPÇÃO, 2001; PERRIN & ARMAREGO, 1988).

## **2. MATÉRIAS E MÉTODOS**

### **2.1. AMOSTRAS**

Frascos de clorofórmio, acetonitrila e hexano grau P. A. fora do prazo de validade foram utilizados no processo de purificação. Em outra metodologia de recuperação da acetonitrila, utilizou-se um frasco de 4L contendo a fase móvel da análise de açúcares.

### **2.2. PURIFICAÇÃO DO CLOROFÓRMIO**

A medida do pH do clorofórmio, para verificar a presença de ácido clorídrico, foi feita por partição com água ultrapura (pH 6) 1:1 (v/v) e medindo-se o pH da fase aquosa, cujo valor (pH 1) indicou a presença de HCl. Em seguida, o clorofórmio foi filtrado à pressão reduzida em leito com 7,0cm de espessura e 410g de alumina neutra Merck® 90 (63-200 $\mu\text{m}$ ) ativada a 110°C por 24h. O objetivo da filtração foi remover possíveis contaminantes mais polares, assim como o foscênio. Depois de filtrado, o clorofórmio foi agitado com lentilhas de NaOH durante a noite para neutralização do ácido, lavado com água ultrapura (1:1 v/v) sucessivamente até obter-se pH da fase de 5 a 6. Em seguida, o solvente foi armazenado em frasco âmbar contendo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro como secante e submetido à destilação fracionada. A lavagem com água elimina os resíduos de foscênio e álcali presentes e neutraliza o diclorocarbano ( $\text{CCl}_2$ ) formado durante a etapa de neutralização. Ao final o clorofórmio foi armazenado em frasco âmbar com 1% (v/v) de etanol grau HPLC como agente estabilizante.

### **2.3. PURIFICAÇÃO DA ACETONITRILA**

Na primeira metodologia, a acetonitrila foi filtrada sob leito de alumina neutra, como no tratamento do clorofórmio, para remover contaminantes mais polares como fenóis (PERRIN & ARMAREGO (1988). Após a filtração, a acetonitrila foi armazenada em frasco âmbar com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro como secante e submetida à destilação fracionada. Na segunda metodologia, quatro litros da fase móvel utilizada na análise de açúcares por CLAE (75:25  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  v/v) foram coletados na saída do detector e mantidos em freezer a -18°C até ocorrer a separação das fase orgânica e aquosa. A acetonitrila (fase orgânica) foi recuperada e armazenada em frasco âmbar contendo 30g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro como secante.

### **2.4. PURIFICAÇÃO DO HEXANO**

O hexano foi agitado com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado por 24h com uma razão de 60:1 hexano: $\text{H}_2\text{SO}_4$  (v/v). Ao final deste tempo o ácido foi removido, o hexano lavado duas vezes com solução saturada de  $\text{CaCO}_3$  1:1 (v/v), lavado em seguida com água ultrapura com a mesma razão volumétrica, armazenado em frasco âmbar contendo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro como secante e submetido à destilação fracionada.

### **2.5. PURIFICAÇÃO DA ALUMINA NEUTRA**

Após a etapa de filtração dos solventes, a alumina foi recuperada, para posterior reutilização, mediante filtração com 300mL de metanol grau HPLC e 500mL de água ultrapura sob vácuo. Em seguida, a alumina foi ativada a 110°C em estufa por 24h. Esta etapa foi realizada após a filtração de aproximadamente seis litros de cada solvente.

## 2.6. DESTILAÇÃO FRACIONADA

A destilação foi realizada em sistema de destilação fracionada semi automatizado modelo NGW equipado com controle digital de temperatura, razão de refluxo de 0,75 descartando-se a fração inicial (cabeça) e final (cauda). No caso do clorofórmio, o solvente foi armazenado em frasco âmbar contendo 1% (v/v) de etanol grau HPLC como agente.

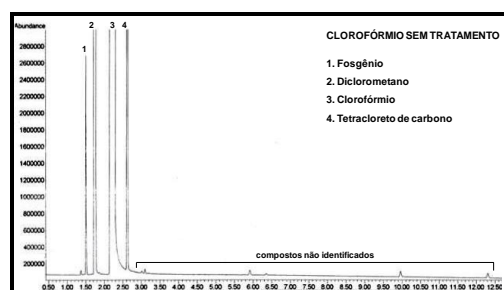
## 2.7. ANÁLISES POR CG-EM

Utilizou-se um cromatógrafo a gás modelo Agilent® 6890, detector de massas Agilent® 5973N com fonte de impacto eletrônico (EI) a 70eV, coluna da J&W Scientific HP<sub>5</sub> (30mx0,25mmx0,25µm), injeção de 1µL em *splitless*, T<sub>inj.</sub> 250°C, T<sub>ini.</sub> 40°C, gradiente de temperatura 40-150°C a 5°C/min., 150-240°C a 10°C/min., hélio como gás de arraste a vazão de 1,0mL/min.

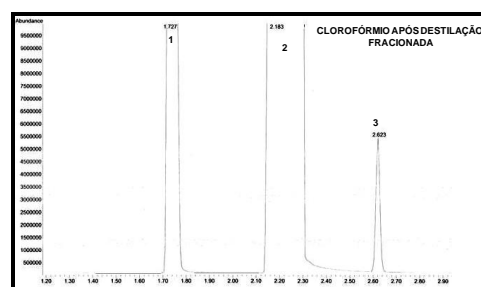
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudos de separação de extratos vegetais em colunas de sílica gel, a presença de ácido no solvente pode gerar *artefatos* dos metabólitos oriundos do metabolismo secundário do vegetal. Os teores de fosgênio, diclorometano e tetracloreto de carbono presentes no clorofórmio sem tratamento foram 1,23%, 21,79% e 6,77%, respectivamente.

A análise do clorofórmio, após a destilação, indicou a eliminação dos contaminantes, do ácido clorídrico e do fosgênio presentes no clorofórmio sem tratamento (**FIGURAS 1 e 2**).



**FIGURA 1.** Cromatograma da análise do clorofórmio sem tratamento.



**FIGURA 2.** Cromatograma da análise do clorofórmio após destilação fracionada, onde (1) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (2) CHCl<sub>3</sub> e (3) CCl<sub>4</sub>.

A destilação fracionada não removeu completamente o CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e o CCl<sub>4</sub> presentes no clorofórmio, porém reduziu em 48% o teor de CCl<sub>4</sub> em relação ao solvente não tratado.

O hexano, submetido à agitação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, indicou a presença de contaminantes em função da coloração alaranjada do ácido (**FIGURA 3**), sendo submetido ao processo de purificação descrito.

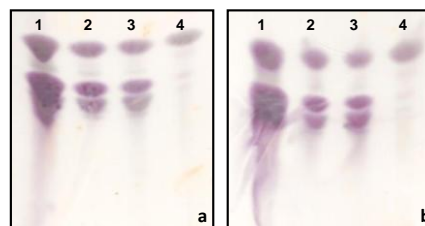
O hexano e o clorofórmio obtidos foram testados, separadamente, como fase móvel na análise de uma mistura de limonóides por cromatoplacas de sílica e o perfil cromatográfico foi comparado ao obtido utilizando-se fase móvel preparada com hexano e clorofórmio grau HPLC. Em ambos os casos, o solventes tratados apresentaram o mesmo perfil cromatográfico (número de componentes), valores de fator de retenção (R<sub>f</sub>) e seletividade (α), quando comparados com o clorofórmio e o hexano grau HPLC (**FIGURA 4**).

A presença de tetracloreto de carbono e diclorometano no clorofórmio tratado não interferiu na eficiência de separação cromatográfica, pois, em relação à sílica gel, o

tetracloreto de carbono é um solvente apolar e o clorofórmio e o diclorometano apresentarem polaridades relativas iguais ( $\epsilon^{\circ}$  diclorometano 0.30;  $\epsilon^{\circ}$  clorofórmio 0.31).

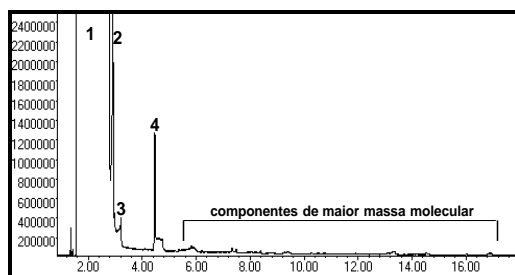


**FIGURA 3.** Resíduo de ácido sulfúrico obtido no tratamento do hexano PA.

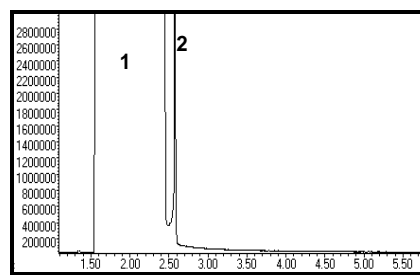


**FIGURA 4.** Cromatoplasas de sílica das amostras de limonóides utilizando  $\text{CHCl}_3$  tratado (a) e  $\text{CHCl}_3$  grau HPLC Tedia® (b).

Após a purificação em leito de alumina e destilação fracionada, a acetonitrila tratada apresentou uma pequena fração de propanonitrila (**FIGURAS 5 e 6**). A acetonitrila obtida por esta metodologia, assim como a obtida pela metodologia que utiliza congelamento na etapa de separação, foram testadas como fase móvel na análise de açúcares por CLAE. Em ambos os casos, não foram observadas alterações nos tempos de retenção e na sensibilidade de resposta para os açúcares analisados por CLAE com coluna amino, fase móvel 75:25  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (V/V) e detecção por índice de refração.



**FIGURA 5.** Cromatograma da análise da acetonitrila P.A. sem tratamento, onde (1) acetonitrila, (2) propanonitrila, (3) 1,2-dicloroetano e (4) tolueno.



**FIGURA 6.** Cromatograma da análise da acetonitrila P.A. após tratamento, onde (1) acetonitrila e (2) propanonitrila.

#### 4. CONCLUSÕES

Os métodos desenvolvidos mostraram-se rápidos e de fácil execução, permitindo o tratamento e recuperação de grandes quantidades de solvente com qualidade adequada para uso na purificação de extratos vegetais e na análise de açúcares por CLAE. A recuperação e reutilização da alumina no processo de filtração contribuem para a diminuição dos custos desta metodologia. Além de contribuir para a redução dos custos com a compra de solvente, estas metodologias proporcionam uma significativa economia ao reduzir as quantidades de resíduos enviados para descarte e incineração.

#### 5. BIBLIOGRAFIA

- MORITA, T. & ASSUMPÇÃO, R. M. V. (2001). Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação. 11<sup>a</sup> ed., Edgard Blücher LTDA, São Paulo, p.466.
- PERRIN, D. D. & ARMAREGO, W. L. F. (1988). Purification of laboratory chemicals. 3<sup>a</sup> ed., Pergamon Press, New York, p.369.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. & GLAJCH, J. L. (1997). Practical HPLC method development. 2<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons Inc., New York, 765p.
- WINDHOLZ, M.; BUDAVARI, S.; BLUMETTI, R. F. & OTTERBEIN, E. S. (1983). The Merck Index. 10<sup>a</sup> ed., Merck & Co., New Jersey, p.10.